

イプロニダゾール、ジメトリダゾール、 メトロニダゾール及びロニダゾール試験法（案）

イプロニダゾールは、一律基準で規制されているところであるが、食品安全委員会による食品健康影響評価において「イプロニダゾールについては、遺伝毒性を示す可能性を否定することができず、発がん性が示唆されたことから、ADI を設定すべきではないと判断した。」と評価された。

ジメトリダゾール、メトロニダゾール及びロニダゾールは、ポジティブリスト制度導入時に、食品中に「不検出」とする農薬等の成分である物質として新たに定められ、その後、平成 26～27 年に見直しが行われた。これより食品安全委員会による食品健康影響評価において「ジメトリダゾールについては、DNA との共有結合残留物が精製される可能性があること、遺伝毒性を示す可能性を判断することはできず、発がん性が示唆されたこと及び ADI の設定に適切な NOAEL 等が得られなかったことから、ADI を設定できなかった。」「メトロニダゾールは遺伝毒性発がん物質であることが否定できず、ADI を設定することは適当でない。」及び「ロニダゾールの遺伝毒性を判断できず、発がん性が示唆されたことから、ADI を設定すべきでない」と判断した。」と評価された。

この評価結果をふまえ、イプロニダゾール、ジメトリダゾール、メトロニダゾール及びロニダゾールは、平成 28 年 3 月に、薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会において、「食品に含有されるものであってはならない」（以下「不検出基準」という。）と改定することとされた。

従来、不検出基準を含む農薬等については、試験法の検出限界により規制が行われることから、規格基準の改正と同時に試験法を告示し、併せてその検出限界が別途通知されているところである。

既存試験法はジメトリダゾール、メトロニダゾール及びロニダゾールのみを分析対象として開発されたものであり、イプロニダゾール及びその他の規制対象物質を分析対象としてその試験法の性能が評価されたものではない。そのため、イプロニダゾール、ジメトリダゾール、メトロニダゾール及びロニダゾールの試験法について開発が進められてきたところ、今般、その開発が終了したため、同試験法について審議するものである。

1. 概要

(1) 分析対象の化合物

イプロニダゾール：イプロニダゾール、1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾール（以下「イプロニダゾール代謝物B」という。）

ジメトリダゾール：ジメトリダゾール、2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール（以下「HMMNI」という。）

メトロニダゾール：メトロニダゾール、1-(2-ヒドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチ

ル-5-ニトロイミダゾール（以下「メトロニダゾール代謝物A」という。）

ロニダゾール：ロニダゾール、HMMNI

(2) 分析対象食品

畜水産物

(3) 試験法の概要

各分析対象化合物を試料から酢酸酸性下アセトンで抽出する。アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂した後、強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラムで精製し、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

(4) 検出限界

イプロニダゾール：0.0001 mg/kg

イプロニダゾール代謝物B：0.0001 mg/kg

ジメトリダゾール：0.0002 mg/kg

メトロニダゾール：0.0001 mg/kg

メトロニダゾール代謝物A：0.0001 mg/kg

ロニダゾール：0.0002 mg/kg

HMMNI：0.0002 mg/kg

2. 真度及び精度の評価

以下の食品を対象として真度及び併行精度の確認を実施した。

牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏の筋肉、鶏卵、さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつ

表 検討結果の真度及び併行精度

		検討結果	目標値
真度	イプロニダゾール	82～92%	70～120%
	イプロニダゾール代謝物 B	88～94%	
	ジメトリダゾール	89～94%	
	メトロニダゾール	82～99%	
	メトロニダゾール代謝物 A	75～86%	
	ロニダゾール	87～95%	
	HMMNI	85～111%	
併行精度	イプロニダゾール	1～3%	30%未満
	イプロニダゾール代謝物 B	1～3%	
	ジメトリダゾール	0.5～3%	
	メトロニダゾール	1～5%	
	メトロニダゾール代謝物 A	2～6%	
	ロニダゾール	2～6%	
	HMMNI	1～8%	

3. 答申案

別紙のとおり。

(参考) これまでの経緯

【イプロニダゾール】

- 平成27年 1月 8日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請
- 平成27年10月27日 食品安全委員会から委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知
- 平成27年12月15日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会
- 平成28年 3月 1日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
- 平成28年 3月10日 残留農薬等公示分析法検討会で検討
- 平成28年 5月17日 薬事・食品衛生審議会へ諮問
- 平成28年 5月18日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに告示試験法改定に係る食品健康影響評価について照会
- 平成28年 5月24日 食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに回答について通知
- 平成28年 5月27日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

【ジメトリダゾール】

平成17年11月29日	残留基準告示
平成24年 2月22日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請
平成27年 4月14日	食品安全委員会から委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知
平成27年12月15日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会
平成28年 3月 1日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
平成28年 3月10日	残留農薬等公示分析法検討会で検討
平成28年 5月17日	薬事・食品衛生審議会へ諮問
平成28年 5月18日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに告示試験法改定に係る食品健康影響評価について照会
平成28年 5月24日	食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに回答について通知
平成28年 5月27日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

【メトロニダゾール】

平成17年11月29日	残留基準告示
平成24年 2月22日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請
平成26年 5月20日	食品安全委員会から委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知
平成27年12月15日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会
平成28年 3月 1日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
平成28年 3月10日	残留農薬等公示分析法検討会で検討
平成28年 5月17日	薬事・食品衛生審議会へ諮問
平成28年 5月18日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに告示試験法改定に係る食品健康影響評価について照会
平成28年 5月24日	食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに回答について通知
平成28年 5月27日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

【ロニダゾール】

平成17年11月29日	残留基準告示
平成24年 2月24日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請
平成26年 7月29日	食品安全委員会から委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知

平成27年12月15日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会
 平成28年 3月 1日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
 平成28年 3月10日 残留農薬等公示分析法検討会で検討
 平成28年 5月17日 薬事・食品衛生審議会へ諮問
 平成28年 5月18日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに告示試験法改定に係る食品健康影響評価について照会
 平成28年 5月24日 食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに回答について通知
 平成28年 5月27日 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

● 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

[委員]

穂山 浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部長
石井 里枝	埼玉県衛生研究所化学検査室長
○大野 泰雄	公益財団法人木原記念横浜生命科学振興財団理事長
尾崎 博	東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室教授
斉藤 貢一	星薬科大学薬品分析化学教室教授
佐々木 一昭	東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門准教授
佐藤 清	一般財団法人残留農薬研究所技術顧問
佐野 元彦	東京海洋大学海洋生物資源学部門教授
永山 敏廣	明治薬科大学薬学部薬学教育研究センター基礎薬学部門教授
根本 了	国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長
二村 睦子	日本生活協同組合連合会組織推進本部組合員活動部部長
宮井 俊一	一般社団法人日本植物防疫協会技術顧問
由田 克士	大阪市立大学大学院生活科学研究科公衆栄養学教授
吉成 浩一	静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野教授
鰐淵 英機	大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学教授

(○：部会長)

答申(案)

イプロニダゾール, ジメトリダゾール, メトロニダゾール
及びロニダゾール試験法 (畜水産物)

1. 分析対象化合物

農薬等の成分である物質	分析対象化合物
イプロニダゾール	イプロニダゾール, 1-メチル-2-(2'-ヒドロキシイソプロピル)-5-ニトロイミダゾール (以下「イプロニダゾール代謝物B」という。)
ジメトリダゾール	ジメトリダゾール, 2-ヒドロキシメチル-1-メチル-5-ニトロイミダゾール (以下「HMMNI」という。)
メトロニダゾール	メトロニダゾール, 1-(2-ヒドロキシエチル)-2-ヒドロキシメチル-5-ニトロイミダゾール (以下「メトロニダゾール代謝物A」という。)
ロニダゾール	ロニダゾール, HMMNI

2. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS)

3. 試薬, 試液

次に示すもの以外は, 第2添加物の部C 試薬・試液等の項に示すものを用いる。

アセトニトリル 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

アセトン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

ギ酸 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム (500 mg) 内径12~13 mm のポリエチレン製のカラム管に, 強酸性陽イオン交換樹脂500 mgを充填したもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

n-ヘキサン 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

水 蒸留水, 精製水, 純水等の化学分析に適したものを用いる。当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含む場合には, n-ヘキサン等の溶媒で洗浄したものを用いる。

無水硫酸ナトリウム 当該農薬等の成分である物質の分析の妨害物質を含まないものを用いる。

4. 標準品

イプロニダゾール標準品 本品はイプロニダゾール98%以上を含む。

イプロニダゾール代謝物B標準品 本品はイプロニダゾール代謝物B98%以上を含む。

ジメトリダゾール標準品 本品はジメトリダゾール98%以上を含む。

メトロニダゾール標準品 本品はメトロニダゾール98%以上を含む。

メトロニダゾール代謝物A標準品 本品はメトロニダゾール代謝物A98%以上を含む。

ロニダゾール標準品 本品はロニダゾール98%以上を含む。

HMMNI標準品 本品はHMMNI98%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

a 抽出

試料10.0 g (はちみつの場合は試料10.0 gに水10 mLを加えて溶解したもの) に酢酸1 mL及びアセトン50 mLを加えてホモジナイズし、毎分3,000回転で5分間遠心分離する。上澄液を採り、残留物 (はちみつの場合は水5 mLを加えて溶解したもの) にアセトン30 mLを加えてホモジナイズし、上記と同様の条件で遠心分離する。上澄液を採り、先の上澄液と合わせ、アセトンを加えて正確に100 mLとする。

この溶液から正確に10 mLを分取し、40°C以下で約2 mLに濃縮する。これに*n*-ヘキサン飽和アセトニトリル10 mL及び*n*-ヘキサン10 mLを加えて振とう後、毎分3,000回転で5分間遠心分離する。アセトニトリル層を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。残留物に2 vol%ギ酸5 mLを加えて溶かす。

b 精製

強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム (500 mg) にアセトニトリル5 mL, 2 vol%ギ酸5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに1) で得られた溶液を注入した後、更に2 vol%ギ酸5 mL, メタノール5 mL, 0.5%アンモニア水5 mLを順次注入し、流出液は捨てる。次いでアセトニトリル及び水 (1:3) 混液10 mLを注入し、溶出液を採る。

この溶出液に、硫酸アンモニウム2 gを加えて溶解した後、酢酸エチル10 mLずつで2回振とう抽出する。抽出液を合わせ、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、無水硫酸ナトリウムをろ別した後、ろ液を40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を0.1 vol%ギ酸に溶かし、正確に1 mLとしたものを試験溶液とする。

6. 操作方法

a 検量線の作成

各標準品の0.1 vol%ギ酸の溶液を数点調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、イプロニダゾール、イプロニダゾール代謝物B、メトロニダゾール及びメトロニダゾール代謝物Aにあつては、試料中0.0001 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0001 mg/Lである。同様に、ジメトリダゾール、ロニダゾール及びHMMNIにあつては、試料中0.0002 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0002 mg/Lである。

b 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、7. の検量線で各分析対象化合物の含量を求める。

c 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

d 測定条件

(例)

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル 内径3 mm, 長さ150 mm, 粒子径3 μm

カラム温度：40°C

移動相：0.1 vol%ギ酸 (A液) 及び0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (B液) を, 下表の濃度勾配で送液する。

時間 (分)	A液 (%)	B液 (%)
0	98	2
5	90	10
15	5	95
20	5	95

イオン化モード：エレクトロスプレーイオン化法 (ポジティブイオンモード)

主なイオン (m/z)

イプロニダゾール：プリカーサーイオン 170, プロダクトイオン 124, 109

イプロニダゾール代謝物B：プリカーサーイオン 186, プロダクトイオン 168, 122

ジメトリダゾール：プリカーサーイオン 142, プロダクトイオン 96, 95

メトロニダゾール：プリカーサーイオン 172, プロダクトイオン 128, 82

メトロニダゾール代謝物A：プリカーサーイオン 188, プロダクトイオン 126, 123

ロニダゾール：プリカーサーイオン 201, プロダクトイオン 140, 55

HMMNI：プリカーサーイオン 158, プロダクトイオン 94, 55

注入量：5 μL

保持時間の目安

イプロニダゾール：15分

イプロニダゾール代謝物B：13分

ジメトリダゾール：12分

メトロニダゾール：11分

メトロニダゾール代謝物A：11分

ロニダゾール：12分

HMMNI：11分